临床研究

B淋巴细胞活化因子在视神经脊髓炎患者血清及脑脊液中的表达及意义

杨 芬[1],黄德晖[2],吴卫平[1]
解放军总医院[1]南楼神经内科,[2]神经内科,北京 100853

摘要:目的 探讨B淋巴细胞活化因子(BAFF)在视神经脊髓炎(NMO)患者血清及脑脊液中的表达情况及临床意义。**方法** 收集44例NMO患者及38例多发性硬化(MS)患者的临床资料,患者均为急性复发期。30例健康人和15例非炎性神经系统疾病患者分别作为对照组,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测血清及脑脊液中BAFF水平。**结果** NMO组、MS组和对照组血清中BAFF水平分别为250.2±126.9、249.6±130.7和222.9±126.1 pg/ml,3组间两两比较,差异无统计学意义(P>0.05)。NMO组、MS组和对照组脑脊液中BAFF水平分别为525.8±230.0、298.4±141.9和141.4±76.2 pg/ml,3组间两两比较,NMO组和MS组脑脊液中BAFF水平较对照组明显增高,NMO组脑脊液中BAFF水平较MS组明显增高(P<0.05)。且NMO组、MS组脑脊液中BAFF水平与EDSS评分存在相关性,EDSS评分越高,其脑脊液中BAFF水平越高。但是NMO组脑脊液中BAFF水平与AQP4抗体滴度之间不具有相关性。**结论** 脑脊液中BAFF水平可能是NMO和MS鉴别诊断的生物标记物,并在判定疾病严重程度方面具有重要价值。

关键词:B淋巴细胞活化因子;视神经脊髓炎;多发性硬化;血清;脑脊液

Investigation of B-cell activating factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuromyelitis optica

YANG Fen[1], HUANG Dehui[2], WU Weiping[1]
[1]Department of Nanlou Neurology, [2]Department of Neurology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To study the expression of B-cell activating factor (BAFF) in the serum and cerebrospinal fluid of patients with neuromyelitis optica (NMO). **Methods** Clinical data were collected from 44 patients with NMO and 38 patients with multiple sclerosis (MS). Thirty healthy controls and 15 controls with noninflammatory neurological diseases were also recruited. The concentration of BAFF in the serum and cerebrospinal fluid were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The mean serum BAFF level was 250.2±126.9 pg/ml in NMO patients, 249.6±130.7 pg/ml in MS patients, and 222.9±126.1 pg/ml in the control subjects, showing no significant difference among the 3 groups (P>0.05). The mean BAFF level in the CSF was significantly higher in NMO patients than in MS patients (525.8±230.0 pg/ml *vs* 298.4±141.9 pg/ml, P<0.05), and higher in MS patients than in the control subjects (141.4±76.2 pg/ml, P<0.05). Both NMO and MS group showed a positive correlation between EDSS scores and CSF BAFF level. But in NMO patients, CSF BAFF level was not associated with AQP4-antibody titer. **Conclusion** BAFF in the CSF may be a useful biomarker for a differential diagnosis of NMO from MS and has an important value in evaluating the disease severity.

Key words: B cell activating factor; neuromyelitis optica; multiple sclerosis; serum and cerebrospinal fluid

B淋巴细胞活化因子(BAFF)属肿瘤坏死因子超家族成员,对B细胞的增殖、分化及生存起重要作用[1]。BAFF水平异常影响产生自身抗体B细胞的存活信号通路,从而诱发疾病[2]。BAFF与自身免疫性疾病的关系非常密切。已有研究证实,BAFF在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征、重症肌无力等自身免疫疾病的发病中扮演重要角色。BAFF在多发性硬化(MS)中的作用也逐渐引起学者的重视。未经治疗的MS患者,外周血清BAFF水平与健康正常人无差异,经干扰素-β(IFN-β)治疗的MS患者外周血清中BAFF水平明显升高[3]。BAFF受体表达缺陷的MS动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),BAFF水平增高,病情加重,提示BAFF可能通过其受体通路参与了MS的发病过程[4]。Zhou等[5]进一步研究发现,BAFF影响Th17细胞的生成,BAFF的拮抗剂有可能成为治疗MS的有效手段。

BAFF在NMO发病中的作用目前还不完全清楚。本研究将探讨NMO患者血清及脑脊液中BAFF的表达情况,明确BAFF能否作为一种生物标记物,以鉴别

收稿日期:2014-12-18
基金项目:十二五国家科技支撑计划(2012BAI08B06)
The National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (2012BAI08B06).
作者简介:杨 芬,在读博士研究生,E-mail: yangfenyy@163.com
通信作者:黄德晖,博士,副主任医师,E-mail: huangdehui@gmail.com;吴卫平,博士,主任医师,博士生导师,E-mail: wuwp@vip.sina.com

NMO和MS。同时结合扩展残疾评分(EDSS)和水通道蛋白4(AQP4)抗体滴度，判定BAFF在推测NMO疾病的活动性中可能起到的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

收集2012年4月~2013年10月就诊于解放军总医院门诊及住院部的NMO和MS患者的临床资料，所有患者均为急性复发期，临床类型为复发-缓解型(急性复发期定义：患者出现新的神经缺损症状体征，持续时间至少24 h或以上，EDSS评分增加≥1分)。其中NMO患者44例，符合2006年修订的NMO诊断标准；MS患者38例，符合2010年的Mcdonald诊断标准。对照组血清标本来自体检中心健康正常人，共30例；对照组脑脊液标本来自同期住院的非炎性神经系统疾病住院患者共15例(其中运动神经元病9例，偏头痛4例，低颅压综合征2例)。所有研究对象6个月内均未服用任何影响免疫功能的药物(如肾上腺皮质激素、免疫抑制剂或其他免疫调节剂等)。NMO和MS患者在急性复发期1周内，应用大剂量皮质类固醇激素治疗前采集血清及脑脊液标本。

1.2 方法

1.2.1 标本采集　所有受试对象在征得知情同意后，抽取晨起空腹静脉血2管，每管4 ml，置EDTA抗凝管中，其中一份静脉血在室温条件下以3000 r/min离心15 min，取上清，置于EP管中-80 ℃冰箱保存备用。另一份送检AQP4抗体滴度。签署腰椎穿刺知情同意书后，留取脑脊液4 ml，置于EP管中-80 ℃冰箱保存备用。所有标本统一进行检测。

1.2.2 主要仪器设备及试剂　RT-6000酶标分析仪(中国深圳雷杜生命科学股份有限公司)；人BAFF/BLyS/TNFSF13B/ELISA试剂盒(美国R&D Systems)。

1.2.3 临床资料收集　登记所有研究对象的性别、年龄、病程、用药史、复发次数和EDSS评分等项目。其中EDSS评分由两名神经科医生来完成。

1.2.4 AQP4抗体滴度测定　患者的一份血清送至德国柏林医学诊断检验中心，采用细胞间接免疫荧光法检测血清AQP4抗体滴度[6]。

1.2.5 血清及脑脊液中BAFF水平的测定　采用ELISA方法进行检测，按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

应用SPSS15.0软件完成。计量资料以均数±标准差表示，各组间比较采用t检验，BAFF水平与EDSS评分，BAFF水平与AQP4抗体滴度之间的相关性，采用Pearson相关分析。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料

NMO患者44例，其中女性33例，男性11例，平均发病年龄35.0±10.2岁(12~64岁)，平均病程15.6±10.3年，平均复发次数4.0±1.8次，平均EDSS评分4.1±2.0，AQP4-Ab阳性率为72.7%(32/44)；MS患者38例，其中女性29例，男性9例，平均发病年龄37.2±11.7岁(14~70岁)，平均病程17.8±12.3年，平均复发次数3.2 ± 2.1次，EDSS评分2.6±1.5，AQP4-Ab阳性率为0%(0/38)；对照组A(采集血清标本)30例，其中女性23例，男性7例，平均年龄39.0±6.2岁；对照组B(采集脑脊液标本)15例，其中女性11例，男性4例，平均年龄36.1±6.5岁。各组间在性别、年龄方面无统计学差异。

2.2 血清及脑脊液中BAFF水平测定结果

NMO组血清BAFF平均水平为250.2±126.9 pg/ml，MS组血清BAFF平均水平为249.6±130.7 pg/ml，对照组血清BAFF平均水平为222.9±126.1 pg/ml，3组间两两比较差异无统计学意义(P>0.05)；与对照组(脑脊液BAFF平均水平为141.4±76.2 pg/ml)比较，NMO组和MS组脑脊液BAFF水平(分别为525.8±230.0 pg/ml和298.4±141.9 pg/ml)明显升高，差异具有统计学意义(P<0.01)；与MS组比较，NMO组脑脊液BAFF水平明显升高，差异具有统计学意义(P<0.01)。

2.3 脑脊液BAFF水平与EDSS评分的关系

NMO组、MS组脑脊液中BAFF水平均与EDSS评分存在相关性，EDSS评分越高，其脑脊液中BAFF水平越高(图1、2)。

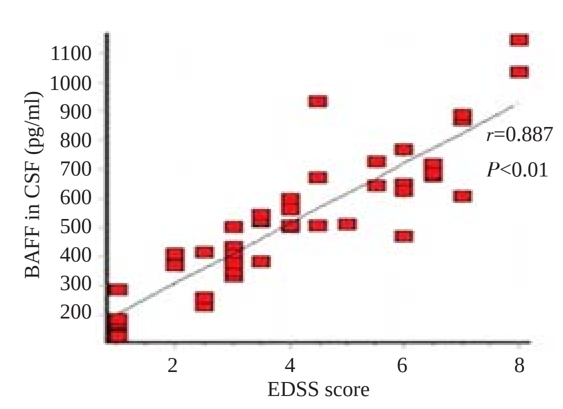


图1　NMO组脑脊液中BAFF水平与EDSS评分的关系

Fig.1 Relationship between CSF BAFF levels and EDSS scores in NMO group.

2.4 NMO组脑脊液中BAFF水平与AQP4-Ab滴度的关系

44例NMO患者中，AQP4-Ab阳性者共有32例。NMO组EDSS评分与血清AQP4-Ab滴度不具有相关性(图3)，脑脊液BAFF水平与血清AQP4-Ab滴度也不具有相关性(图4)。

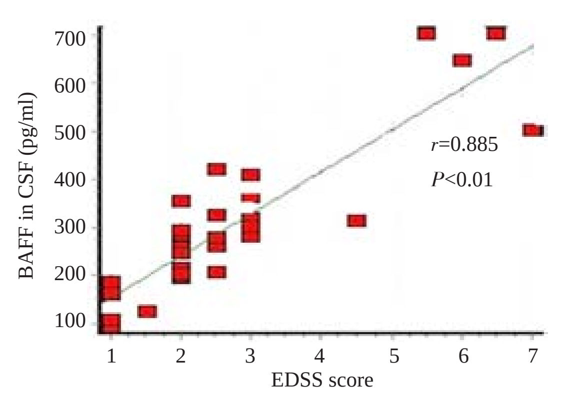


图2 MS组脑脊液中BAFF水平与EDSS评分的关系
Fig.2 Relationship between CSF BAFF levels and EDSS scores in MS group.

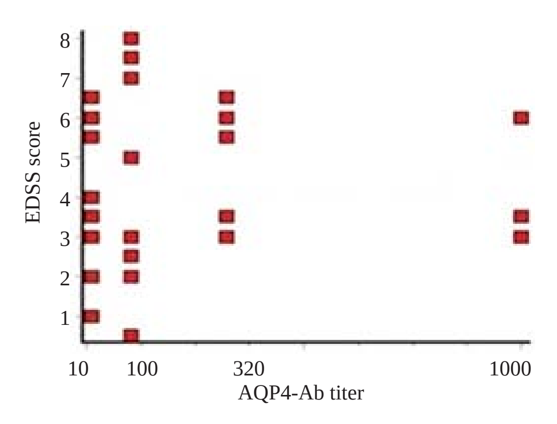


图3 NMO组EDSS评分与AQP4-Ab滴度的关系
Fig.3 Relationship between EDSS scores and AQP4-Ab titer in NMO group.

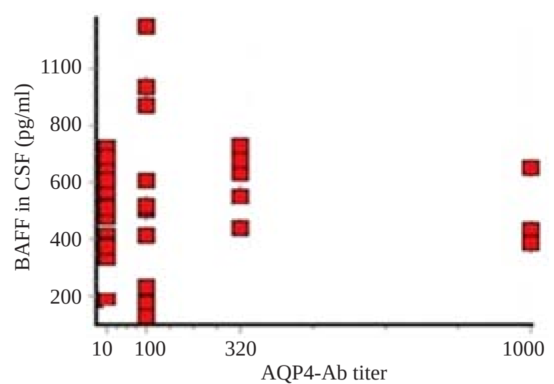


图4 NMO组脑脊液中BAFF水平与AQP4-Ab滴度的关系
Fig.4 Relationship between CSF BAFF level and AQP4-Ab titer in NMO group.

3 讨论

在一些系统性自身免疫性疾病，如系统性红斑狼疮和类风湿关节炎，血清中BAFF水平明显增高[7-8]，而在一些器官特异性自身免疫性疾病，如胆汁性肝硬变和自身免疫性糖尿病，并未发现血清中BAFF水平表达异常[9-10]。NMO、MS作为仅累及CNS的自身免疫性疾病，我们推测其BAFF的表达可能与器官特异性自身免疫疾病类似。本研究结果验证了我们的假设，NMO组、MS组血清BAFF的水平与健康正常人比较未发现差异，血清BAFF水平尚不能作为NMO和MS鉴别诊断的生物标记物。但是，有学者发现，应用IFN-β或醋酸格拉替雷治疗的MS患者，血清BAFF水平明显升高，是监测MS患者药物治疗反应的有效指标之一[11]。Nakashima等[12]发现，应用针对B细胞表面CD20标记的利妥昔单抗治疗NMO的最初两周，患者会出现一过性的病情加重，其原因是血清中BAFF水平升高，介导了AQP4抗体滴度的一过性升高。IFN-β和醋酸格拉替雷是治疗MS的两种重要药物，但若应用于NMO患者，可能疗效甚微，甚至会使患者病情恶化，其原因可能与血清BAFF表达水平上调，B细胞活化，导致抗体介导的自身免疫反应增强有关。对于接受药物治疗的NMO和MS患者，血清BAFF不仅可以监测治疗反应，有时可能是二者鉴别诊断的有效生物标记物。

本研究同时发现，NMO组、MS组脑脊液中BAFF水平较对照组明显升高，并且NMO组脑脊液中BAFF水平较MS组升高更加明显。此结果与国外一项研究报道一致，一小样本（n=8）白种人群NMO患者，脑脊液中BAFF表达水平明显升高[13]。NMO是一种星形胶质细胞疾病，其星形胶质细胞损伤比髓鞘脱失更加严重。星形胶质细胞作为一种抗原呈递细胞，在激活或损伤后，分泌多种细胞因子，从而触发免疫反应[14]。在CNS，BAFF主要由星形胶质细胞产生，推测NMO组脑脊液中BAFF水平升高与星形胶质细胞的激活或损伤有关。BAFF水平升高，影响B细胞的存活、分化，进一步使B细胞产生的自身抗体AQP4抗体上调，从而促发NMO的病理生理过程。通过对血清细胞因子进行研究，有学者发现，NMO患者较MS患者的炎性反应及抗炎症反应过程更为剧烈[15]。这点也可解释NMO组患者脑脊液中BAFF水平为何较MS组患者更为升高。星形胶质细胞-BAFF-B细胞-AQP4抗体环路可能是参与NMO发病的重要机制之一。

本研究还发现，NMO和MS急性复发期，脑脊液中BAFF水平与EDSS评分存在相关性，说明脑脊液中BAFF水平可作为推测NMO和MS疾病严重程度的一项重要生物标记物。AQP4抗体滴度可能与NMO疾病活动性具有一定相关性。NMO急性复发期AQP4抗体滴度升高，缓解期AQP4抗体滴度下降[16]。但此方面的研究结论不尽一致。本研究结果与Hinson等[17]报道一致，未发现AQP4抗体滴度与EDSS评分具有相关性，也未发现AQP4抗体滴度与脑脊液中BAFF水平具有相关性。可能与采用的AQP4抗体滴度的测定方法、研究的样本量等因素有关。同时，AQP4抗体滴度升高，并不一定预示着急性复发，急性复发期的NMO患者，也并不一定都存在AQP4抗体滴度的升高[18]。

利妥昔单抗对预防NMO复发具有一定的疗效。但是，利妥昔单抗治疗自身免疫性疾病时，患者往往出现血清BAFF水平升高[12]。当治疗停止时，体内新生的不成熟细胞在高水平BAFF环境下，可能会触发新的自身免疫过程而加重病情。BAFF有3种受体：TACI、BCMA和BAFF R受体。在许多B细胞亚群表面BAFF受体与CD20表达有重叠，但对于浆细胞，表面只表达BCMA而无CD20。因此若能以BAFF受体为治疗靶点，效果可能会优于利妥昔单抗。鉴于NMO患者脑脊液中BAFF水平明显增高，血清BAFF水平与对照组表达无差异，进一步研究可透过血脑屏障的BAFF拮抗剂，可能会成为治疗NMO的新方法。

综上所述，NMO患者脑脊液中BAFF水平明显升高，且与EDSS评分具有相关性，脑脊液中BAFF水平可作为NMO与MS鉴别诊断、判定病情严重程度的生物标记物之一。我们应进一步开展免疫学研究，探讨星形胶质细胞-BAFF-B细胞-AQP4-Ab环路在NMO发病机制中的作用，并以BAFF及其受体为治疗靶点，可能会为NMO的治疗提供新的手段。

参考文献：

[1] Shu HB, Hu WH, Johnson H, et al. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens[J]. J Leukoc Biol, 1999, 65(5): 680-3.

[2] Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA, et al. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Invest, 2009, 119(5): 1066-73.

[3] Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, et al. Interferonbeta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity[J]. Brain, 2008, 131(Pt6): 1455-63.

[4] Kim SS, Richman DP, Zamvil SS, et al. Accelerated central nervous system autoimmunity in BAFF-receptor-deficient mice[J]. J Neurol Sci, 2011, 306(1-2): 9-15.

[5] Zhou X, Xia Z, Lan Q, et al. BAFF promotes Th17 cells and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23629.

[6] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquapotin-4 antibody in neuromyelitis optica[J]. Tohoku J Exp Med, 2006, 210(4): 307-13.

[7] Su DL, Lu ZM, Shen MN, et al. Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE[J]. J Biomed Biotech, 2012, 347141.

[8] Woo YJ, Yoon BY, Jhun JY, et al. Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF-κB signaling in rheumatoid arthritis B cells[J]. Exp Mol Med, 2011, 43(6): 350-7.

[9] Zhang B, Hu M, Zhang P, et al. BAFF promotes regulatory T-cell apoptosis and blocks cytokine production by activating B cells in primary biliary cirrhosis[J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(5): 433-9.

[10] Mackay IR, Groom J, Mackay CR. Levels of BAFF in serum in primary biliary cirrhosis and autoimmune diabetes [J]. Autoimmunity, 2002, 35(8): 551-3.

[11] Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, et al. Interferonbeta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity[J]. Brain, 2008, 131(Pt6): 1455-63.

[12] Nakashima I, Takahashi T, Cree BA, et al. Transient increases in anti-aquaporin-4 antibody titers following rituximabtreatment in neuromyelitis optica, in association with elevated serum BAFF levels[J]. J Clin Neurosci, 2011, 18 (7): 997-8.

[13] Vaknin-Dembinsky A, Brill L, Orpaz N, et al. Preferential increase of B-cell activating factor in the cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica in a white population[J]. Mult Scler, 2010, 16 (12): 1453-7.

[14] Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity[J]. Trends Immunol, 2007, 28(3): 138-45.

[15] Wang KC, Lee CL, Chen SY, et al. Distinct serum cytokine profiles in neuromyelitis optica and multiple sclerosis [J]. J Interferon Cytokine Res, 2013, 33(2): 58-64.

[16] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre[J]. Brain, 2007, 130(Pt 5): 1235-43.

[17] Hinson SR, McKeon A, Fryer JP, et al. Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells[J]. Arch Neurol, 2009, 66 (9): 1164-7.

[18] Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica[J]. Brain, 2008, 131 (Pt 11): 3072-80.

（编辑：黄开颜）